



Docket No.: N9460.0022/P022
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Kisaburo Deguchi et al.

Application No.: 10/776,263

Filed: February 12, 2004

Art Unit: N/A

For: SEPARATION ANALYZER

Examiner: Not Yet Assigned

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

Country	Application No.	Date
Japan	2003-064319	March 11, 2003

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith.

Dated: March 18, 2004

Respectfully submitted,

By

Mark J. Thronson

Registration No.: 33,082

DICKSTEIN SHAPIRO MORIN &
OSHINSKY LLP

2101 L Street NW

Washington, DC 20037-1526

(202) 785-9700

Attorney for Applicant

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the
following application as filed with this office.

Date of Application : March 11, 2003

Application Number : Patent Application No. 2003-064319

Applicant (s) : Hitachi High-Technologies Corporation

Dated this 6th day of February, 2004

Yasuo IMAI
Commissioner,
Patent Office

Certificate No. 2003-3007444



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 3月11日
Date of Application:

出願番号 特願2003-064319
Application Number:

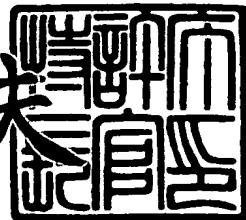
[ST. 10/C] : [JP2003-064319]

出願人 株式会社日立ハイテクノロジーズ
Applicant(s):

2004年 2月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 1103003611

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 30/34

【発明の名称】 分離分析装置

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛1040番地
株式会社 日立サイエンスシステムズ内

【氏名】 出口 喜三郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地
株式会社 日立ハイテクノロジーズ
設計・製造統括本部 那珂事業所内

【氏名】 伊藤 伸也

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛882番地
株式会社 日立ハイテクノロジーズ
設計・製造統括本部 那珂事業所内

【氏名】 伊藤 正人

【特許出願人】

【識別番号】 501387839

【氏名又は名称】 株式会社 日立ハイテクノロジーズ

【代理人】

【識別番号】 100075096

【弁理士】

【氏名又は名称】 作田 康夫

【電話番号】 03-3212-1111

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 分離分析装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の溶液を混合比を変更しながら送液する第1のポンプと、送液用の溶液を送液する第2のポンプと、試料を導入する試料導入部と、試料を分離する分離カラムと、分離カラムから溶出される溶液を検出する検出器を備えた分離分析装置において、

前記第1のポンプからの流路、前記第2のポンプからの流路、及び前記試料導入部への流路が接続され、且つ溶液を一時的に保留する第1及び第2のサンプリングループを備えた流路切り替え手段を有し、

前記流路切り替え手段は、前記第1のポンプからの溶液を前記第1のサンプリングループに送液しながら、前記第2のポンプによって前記第2のサンプリングループ内の溶液を前記試料導入部側へ押出す第1の状態と、前記第1のポンプからの溶液を前記第2のサンプリングループに送液しながら、前記第2のポンプによって前記第1のサンプリングループ内の溶液を前記試料導入部側へ押出す第2の状態とを交互に繰り返すことを特徴とする分離分析装置。

【請求項 2】

請求項1において、

前記流路切り替え手段は、溶液を機外へ排出し、且つ前記分離カラムと同等の流路抵抗を有する排出流路を備え、

前記第1の状態では、前記第1のサンプリングループが当該排出流路へ接続され、前記第2の状態では、前記第2のサンプリングループが当該排出流路へ接続されることを特徴とする分離分析装置。

【請求項 3】

請求項1において、

前記第1のポンプは、マイクロリットル／分(μ l/min) の流量で送液を行い、前記第2のポンプは、ナノリットル／分(n l/min) の流量で送液を行うことを特徴とする分離分析装置。

【請求項4】

請求項1において、

前記第1及び第2のサンプリングループの容積は、略1マイクロリットル($\mu\text{ l}$)であることを特徴とする分離分析装置。

【請求項5】

請求項2において、

前記流路切り替え手段は、前記第1のポンプからの流路が接続される接続口(1)、前記第2のポンプからの流路が接続される接続口(2)、前記試料導入部への流路が接続される接続口(3)、前記排出流路が接続される接続口(4)を備えた第1の部材と、前記第1の状態と第2の状態を切り替える切り替え流路が形成された第2の部材を有し、

前記第1の部材内に、前記第1及び第2のサンプリングループが形成されることを特徴とする分離分析装置。

【請求項6】

請求項1において、

マイクロリットル/分($\mu\text{ l}/\text{min}$)の流量を送液する第3のポンプと、前記分離カラムからの溶出液と前記第3のポンプから送液される溶液を混合するミキサーと、当該ミキサーによって混合された後の溶液の分取を行う分取部とを備えたことを特徴とする分離分析装置。

【請求項7】

請求項1において、装置全体を一定温度に保つ恒温器を備えたことを特徴とする分離分析装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、分離分析技術に係り、特に、ナノフロー流量($\text{n l}/\text{min}$)レベルでの分離分析の実現をするためのグラジエントを行う分離分析装置に関する。

【0002】**【従来の技術】**

クロマトグラフ等の分離分析装置において、ナノフロー流量($n\text{ l}/\text{min}$)でグラジエント溶出を行いながら分析を行うには、マイクロフロー($\mu\text{ l}/\text{min}$)の低圧(または高圧)グラジエント機能付きポンプで送られてくる溶液をスプリッターで分割(例えば、1:100のスプリット比)し、ナノフロー流量($n\text{ l}/\text{min}$)を得る方式や、1分析に要するグラジエント溶液を、あらかじめ1個または多数のチューブやホールに充満させてから、送液ポンプ(またはガスボンベ)とバルブを利用して、これらの溶液を順次分離カラムに導入する方式(例えば、下記特許文献1, 2及び非特許文献1に記載されている)がある。

【0003】

【特許文献1】

特開2002-365272号公報

【特許文献2】

特開2002-71657号公報

【非特許文献1】

BUNSEKI KAGAKU, 51, 825(2001)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

上記に示すスプリッターで分割を行う場合では、流路の詰まりが流量変動につながり、安定した流量を得ることが困難であり、また、1分析に要するグラジエント溶液を、あらかじめ1個または多数のチューブやホールに充満する場合では、1分析ごとに1個または多数のチューブやホールに溶液の充填が必要であり、連続分析を効率良く行うことができない。

【0005】

本発明の目的は、上記問題を解決し、ナノフロー流量($n\text{ l}/\text{min}$)でのグラジエント溶出による分離分析を、安定で、効率よく連続して行えるようにすることである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するための本発明の特徴は、複数の溶液を混合比を変更しながら

ら送液する第1のポンプと、送液用の溶液を送液する第2のポンプと、試料を導入する試料導入部と、試料を分離する分離カラムと、分離カラムから溶出される溶液を検出する検出器を備えた分離分析装置において、前記第1のポンプからの流路、前記第2のポンプからの流路、及び前記試料導入部への流路が接続され、且つ溶液を一時的に保留する第1及び第2のサンプリングループを備えた流路切り替え手段を有し、前記流路切り替え手段は、前記第1のポンプからの溶液を前記第1のサンプリングループに送液しながら、前記第2のポンプによって前記第2のサンプリングループ内の溶液を前記試料導入部側へ押出す第1の状態と、前記第1のポンプからの溶液を前記第2のサンプリングループに送液しながら、前記第2のポンプによって前記第1のサンプリングループ内の溶液を前記試料導入部側へ押出す第2の状態とを交互に繰り返すことである。

【0007】

これにより、第1のポンプからマイクロフローレベル($\mu\text{ l}/\text{min}$)の流量でグラジエント溶液を送液しても、流路切り替え手段により第2のポンプからの送液量に容易に変更することが出来、且つグラジエントカーブも第1のポンプから送液されたグラジエントカーブに再現性良く追従することが出来る。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施例を説明する。

【0009】

図1に、本発明の概略構成図を示す。ポンプ1は、マイクロフローレベル($\mu\text{ l}/\text{min}$)の流量で二つの溶液6, 7を低圧グラジエント方式、即ち、電磁弁(ソレノイドバルブ)9, 10のオン/オフで溶液6, 7の組成比を決めて混合し送液を行う(高圧グラジエント方式の場合は、それぞれの溶液に送液ポンプが備えられる)。ポンプ1から送られる溶液は、ミキサー11で混合した後、10方バルブ3へ送液される。

【0010】

10方バルブ3は、サンプリングループ100, 101を備え、ポンプ1から送液された溶液は、バルブ内の中路を切り替えることで、サンプリングループ

100, 101の何れか一つに連通する。サンプリングループ100, 101の容積は、それぞれ1マイクロリットル (μl) 位である。また、切り替えられる流路は、各穴を結ぶ流路である（流路21を除く）。図1の状態では、ポンプ1からの溶液は、サンプリングループ100を経由した後、流路21を介して、抵抗コイル（または、抵抗カラムや圧量調整バルブ）5を経てドレインに流れる流路を形成している。バルブが切り替えられると、ポンプ1からの溶液は、流路21を介して、サンプリングループ101を経由した後、抵抗コイル5を経てドレインに流れる流路を形成する。

【0011】

また、10方バルブ3へは、溶液8をナノフローレベル ($\text{n l}/\text{min}$) の流量で送液するポンプ2（例えば、シリンジ型やレシプロ型のポンプ）がダンパー12を介して接続されている。図1の状態では、ポンプ2からサンプリングループ101を介して溶液に試料を導入するサンプルインジェクタ13に通じる流路が形成されている。バルブが切り替えられると、ポンプ2からサンプリングループ100を介してサンプルインジェクタ13に通じる流路が形成される。

【0012】

サンプルインジェクタ13で試料が注入された後は、分離カラム14で試料が分離され、検出器15によって検出が行われる。検出器15には、例えば、UV-VIS吸光度検出器、蛍光検出器、電気化学検出器、及び質量分析装置等を使用することが出来る。

【0013】

コントローラ4は、ポンプ1, 2の流量、グラジエントプログラム及び10方バルブ3の定期的な切り替えを制御する。もし、ポンプ1自身が定期的にイベント信号を出す機能を持っている場合は、10方バルブ3はポンプ1から制御可能なので、コントローラ4は必ずしも必要ではない。

【0014】

抵抗コイル5は、分離カラム14が連通している時にかかる圧力と同等レベルの圧力がかかるような流路抵抗を有するものである。これにより、10方バルブ3の切り替えに伴う圧力変動を最小限にする効果がある。さらに、ポンプ2のあ

とのダンパー12も同様の効果を果たす。また、ダンパー12はレシプロ型やシリニジ型のポンプ2が発生するパルスモータ由来の脈流を軽減する効果もある。

【0015】

上記ポンプ2が送り出す溶液8は、ポンプ1からの流量に比べて桁違いに小さいために、実際に分離カラム14に到達するわけではない。したがって、ポンプ2には、電気浸透流を起こすのに最適な溶液を用いた電気浸透流ポンプを用いても良い。また同様の理由により、一定圧で送液する場合はガスボンベを用いても良い。

【0016】

図2は、図1の構成で得られるグラジエントカーブを説明するための図である。実線のグラジエントカーブ（実線）はポンプ1から送液される溶液を示し、点線のグラジエントカーブは10方バルブ3を経た後の溶液を示す。

【0017】

10方バルブ3からの送液は、ポンプ2側に連通しているサンプリングループに充填されている溶液が、ポンプ2がナノフローレベル($n l/min$)の流量で送液する溶液8によって押出されることで行われる。サンプリングループの容積は前述のように $1 \mu l$ 程度であるのに対して、ポンプ2側からの送液はナノフロー レベル($n l/min$)の流量であるため、数分間送液しても溶液8がサンプリングループを超えてサンプルインジェクタ13側へ送液されることは無い。サンプルループ内に進入した溶液8は、10方バルブ3が切り替えられた際に、ポンプ1からの新たな組成の溶液によってドレインへ押出され、機外へ排出される。

【0018】

図1の構成において、10方バルブ3が2分ごとに切り替え制御された場合には、10方バルブ3を経た後の溶液のナノフローグラジエントカーブ（点線）は、図2に示すように、2分間隔で階段状に、ポンプ1のグラジエントカーブ（実線）を追隨する。10方バルブ3の切り替えを1分毎に早めれば、ナノフローグラジエントカーブ（点線）は1分間隔で階段状となり、元のグラジエントカーブ（実線）との追隨性は更に改善される。最小のバルブ切り替え時間間隔は、ポンプ1の流量とサンプリングループの容積で決まる。即ち、次式で計算される：

最小のバルブ切り替え時間間隔＝サンプリングループの容積／ポンプ1の流量

【0019】

図3は、ポンプ2の流量500nl/min, ポンプ1の流量50μl/min, サンプリングループの容積1μl, 10方バルブ3は1分毎に流路が切り替えられるという条件の基に得られたナノフローグラジエントカーブを示している。溶液6, 7, 8はそれぞれ、水, 0.1% アセトンを含んだアセトニトリル80%液水を使用した。

【0020】

(A) は、UV吸光度検出器をポンプ1と10方バルブ3の間に接続して、ポンプ1が作製して10方バルブ3に送液する溶液の吸光度(250nm)変化を測定したグラジエントカーブであり、(B) は、UV吸光度検出器を10方バルブ3の後に接続して、実際に分離カラム14に送液される溶液の吸光度(250nm)変化を測定したグラジエントカーブである。(A) と(B) の比較から、この条件下でも追随性の良いグラジエントカーブが得られることが分かる。(B) のカーブの立ち上がりの遅れは、500nlといった低流量であるために、10方バルブ3の下流に接続したUV吸光度検出器に到達する時間が遅れたことによる。

【0021】

本発明においては、サンプルインジェクタ13におけるサンプル導入と同期して、上記ポンプ1のグラジエントカーブ作製のタイムプログラムをスタートさせることにより、サンプルの連続分離分析が可能になる。ポンプ2のシリンジ容積と1分析に必要な溶液量があらかじめ計算されるので、分析中にポンプ2が吸引過程に入る場合は、コントローラ4が、サンプルインジェクタ13にスタート信号を出さないように制御することも可能である。また、1分析終了後のカラム洗浄および平衡化の時間中に、消費した液量を吸引補充できる機能を持つポンプを使用し、吸引過程による流量変動を、分析中に起らないようにすることも可能である。

【0022】

一般に、有機溶媒の組成を時間と共に変えるグラジエント溶出においては、溶

液の粘性の変化により、1分析中にカラム圧力が変化する。この時、抵抗コイル5にかかる圧力を分離カラムにかかる圧力と同等レベルにしておくことにより、10方バルブ3の切り替えに伴う圧力変動を最小限にすることが出来る。その結果、1分析中に起る分離カラムの圧力の変動による流量変動を最小限にする効果がある。

【0023】

また、装置全体を恒温器等の内部に配置するようにし、装置全体を一定温度に保溫するようにすると、ナノフロー流量のより安定した送液を図ることができる。

【0024】

図4は、本発明の他の実施例を示す概略構成図である。図1の実施例との違いは、分取を行う手段を追加した点にある。分離カラム14から溶出する流量は、ナノフロー流量($n\text{ l}/\text{min}$)であり、このレベルの流量になると排出後は液滴とならず、分取は非常に困難になる。そこで本実施例では、分離カラム14からの溶液に対して、マイクアップ溶媒16をマイクアップポンプ17によりミキサー18で合流させるようとする。マイクアップポンプ17の流量は、マイクロフロー流量($\mu\text{ l}/\text{min}$)である。合流後の溶液は、分取プレート19上に分取(分画)される。この時、分取プレート19は、各分画毎に、前後左右に移動可能に構成される。本実施例では、排出後の溶液をマイクロフロー流量($\mu\text{ l}/\text{min}$)とするため、排出後も液滴とできることが可能となる。

【0025】

尚、マイクアップ溶媒16として、マトリックスレーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析計に適した一種または複数の化合物(マトリクス)を溶解した溶液を用いることも可能である。

【0026】

図5、図6は、本発明で用いる改良された10方バルブ3の構成図である。10方バルブ3は、図6に示されるように、ローターシール22、ステーターリング25、ステーターシール24、ステーター23から構成される。

【0027】

図5の円内の細い実線は、ステーターシール24上に刻まれた溝であり、バルブ内の流路の切り替えはこの部分が回転することで行われる。一方、太い実線は、本実施例特有のものであり、ステーター23上に刻まれた溝である。通常の10方バルブでは、サンプリングループ100, 101および流路21には、PEEKやSUSチューブが使用されている。しかし、ナノフロー流量を扱う装置に必要なサンプリングループ容積は、前述のように1マイクロリットル位なので、バルブ内のステーター23上の溝(100, 101)でこれらの構成を代用することができる。また、流路21も同様である。この結果、6個のチューブ接続用の押しネジ穴が節約でき、チューブ接続が簡単になる。また、目詰まりの原因となるゴミがチューブ接続時に混入する可能性を軽減するといった効果がある。

【0028】

【発明の効果】

本発明によれば、1分析に要するグラジエント溶液を予め作製しておく必要は無く、ナノフロー($n l/min$)流量においても再現性の良いグラジエント溶出による分離分析を行うことが出来る。したがって、本発明を用いたナノフロー($n l/min$)流量レベルのグラジエントを行う分析を効率よく連続して行うことが出来る液体クロマトグラフを実現することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施例の概略構成図である。

【図2】

ポンプ1で送液されるグラジエントカーブ(実線)と10方バルブ3から送液されるグラジエントカーブ(点線)を示す図である。

【図3】

ポンプ1で送液されるグラジエントカーブ(実線)と10方バルブ3から送液されるグラジエントカーブ(点線)を実際に測定して得られた結果を示す図である。

【図4】

本発明の他の実施例の概略構成図である。

【図5】

本発明で用いる改良された10方バルブの流路図である。

【図6】

本発明で用いる改良された10方バルブの構成図である。

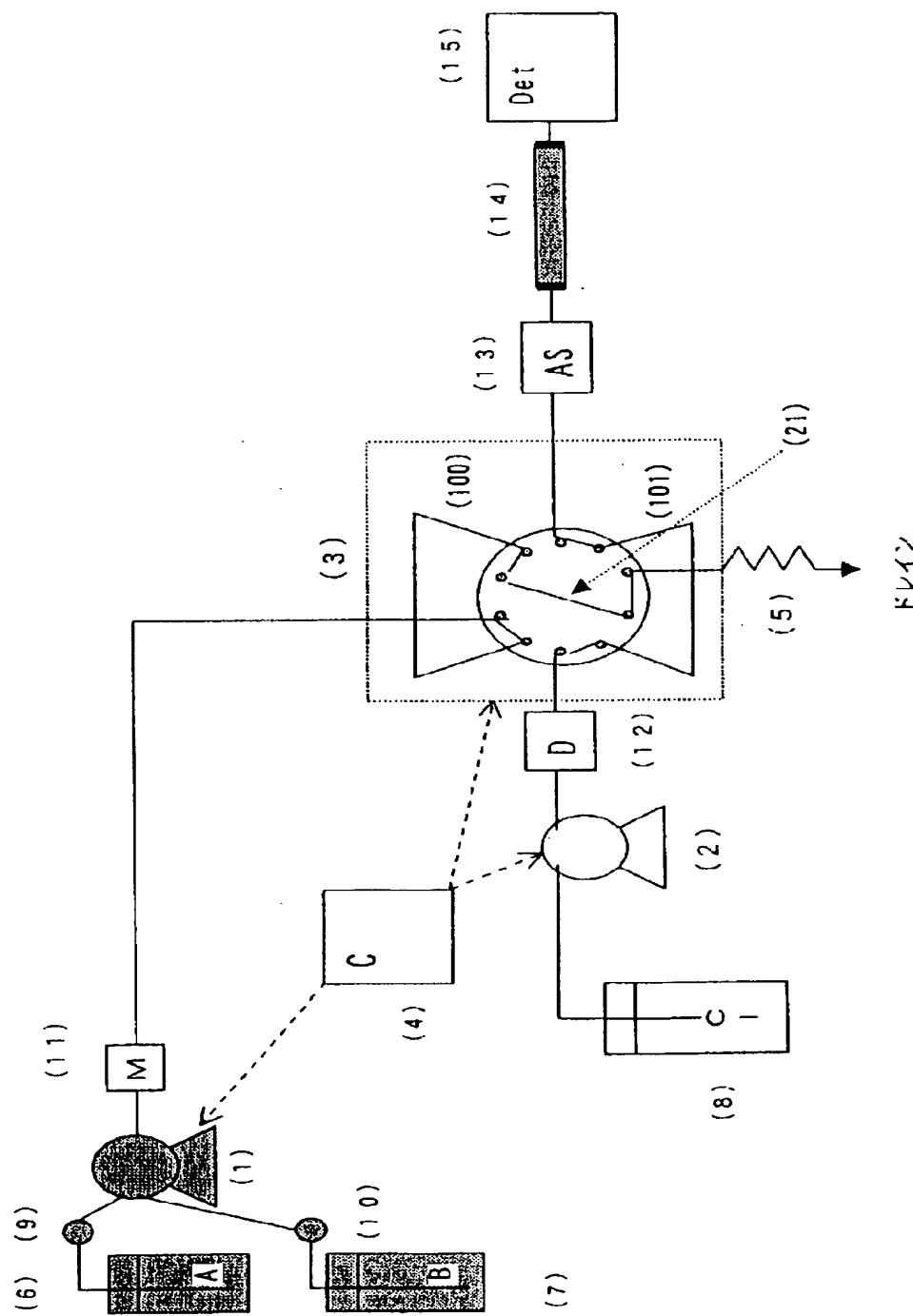
【符号の説明】

1, 2…ポンプ、3…10方バルブ、4…コントローラ、5…抵抗コイル、6, 7, 8…溶液、9, 10…電磁弁（ソレノイドバルブ）、11, 18…ミキサー、12…ダンパー、13…サンプルインジェクタ、14…分離カラム、15…検出器、16…メイクアップ溶媒、17…メイクアップポンプ、19…分取プレート、21…流路、22…ローターシール、23…ステーター、24…ステーターシール、25…ステーターリング、100, 101…サンプリングループ。

【書類名】 図面

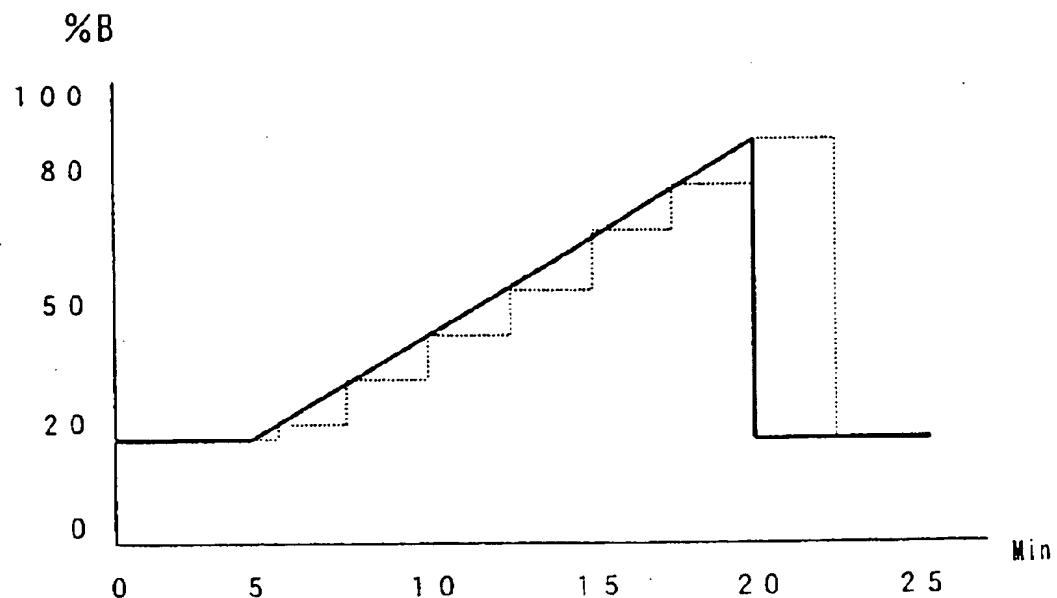
【図 1】

図 1



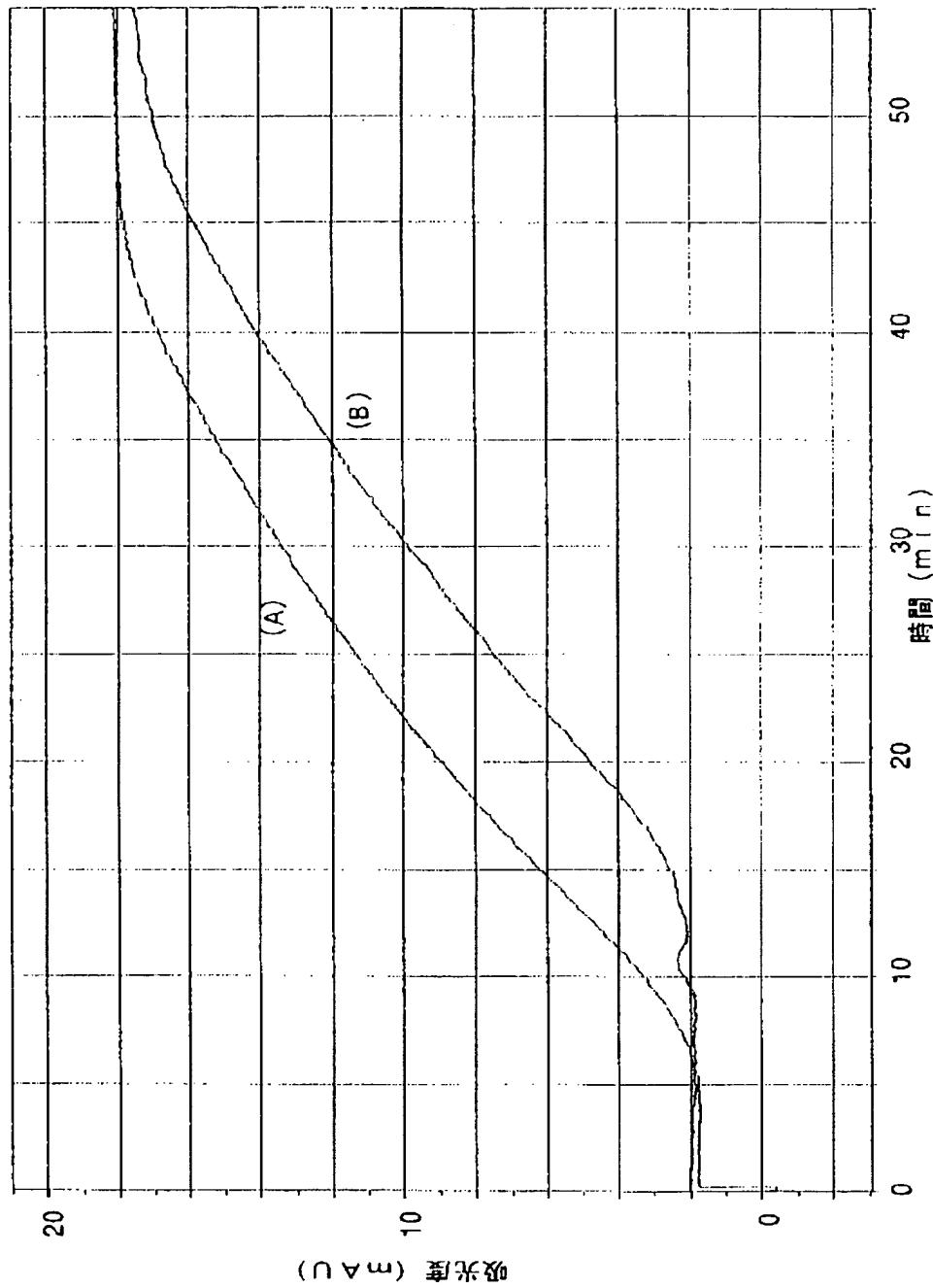
【図 2】

図 2



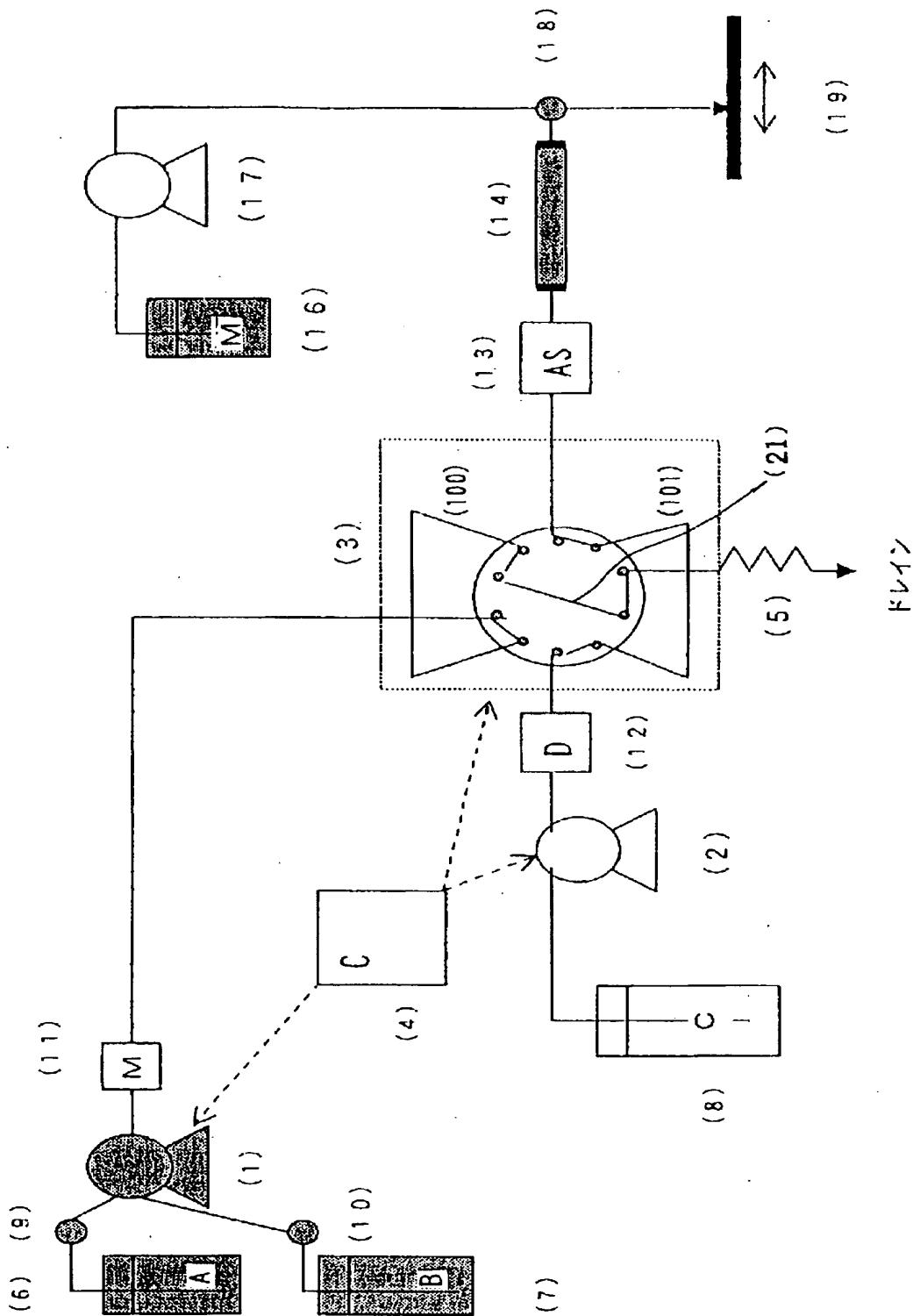
【図 3】

図 3



【図 4】

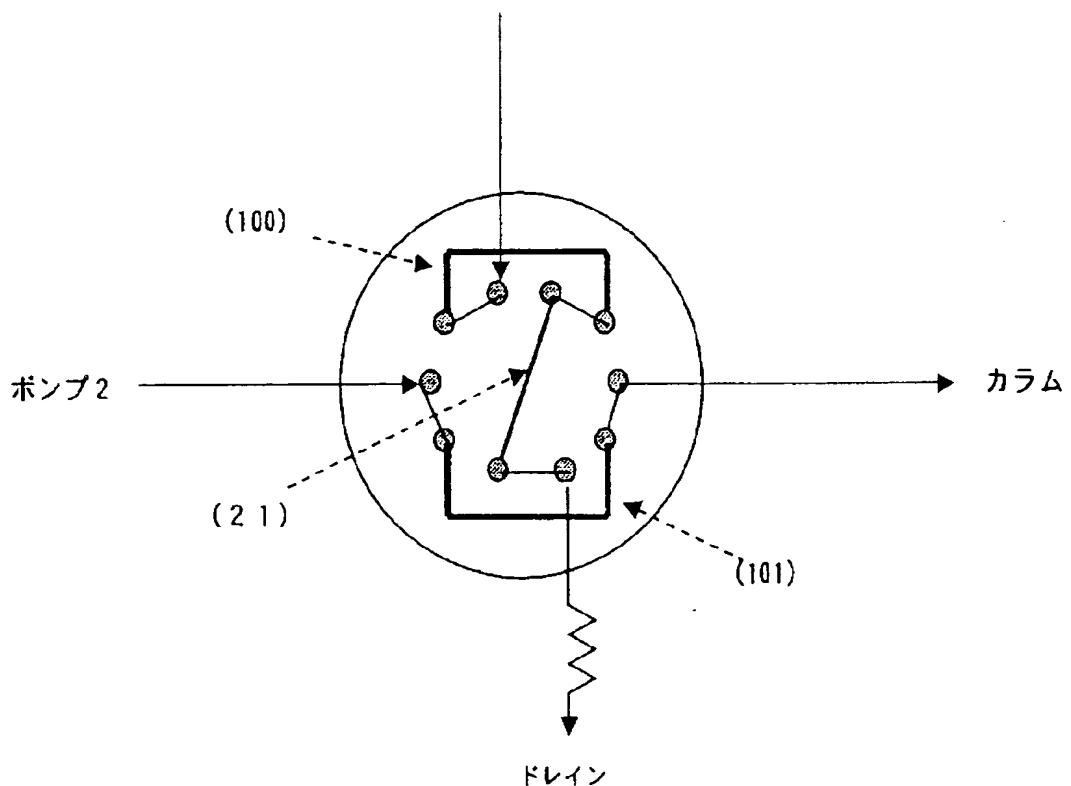
図 4



【図 5】

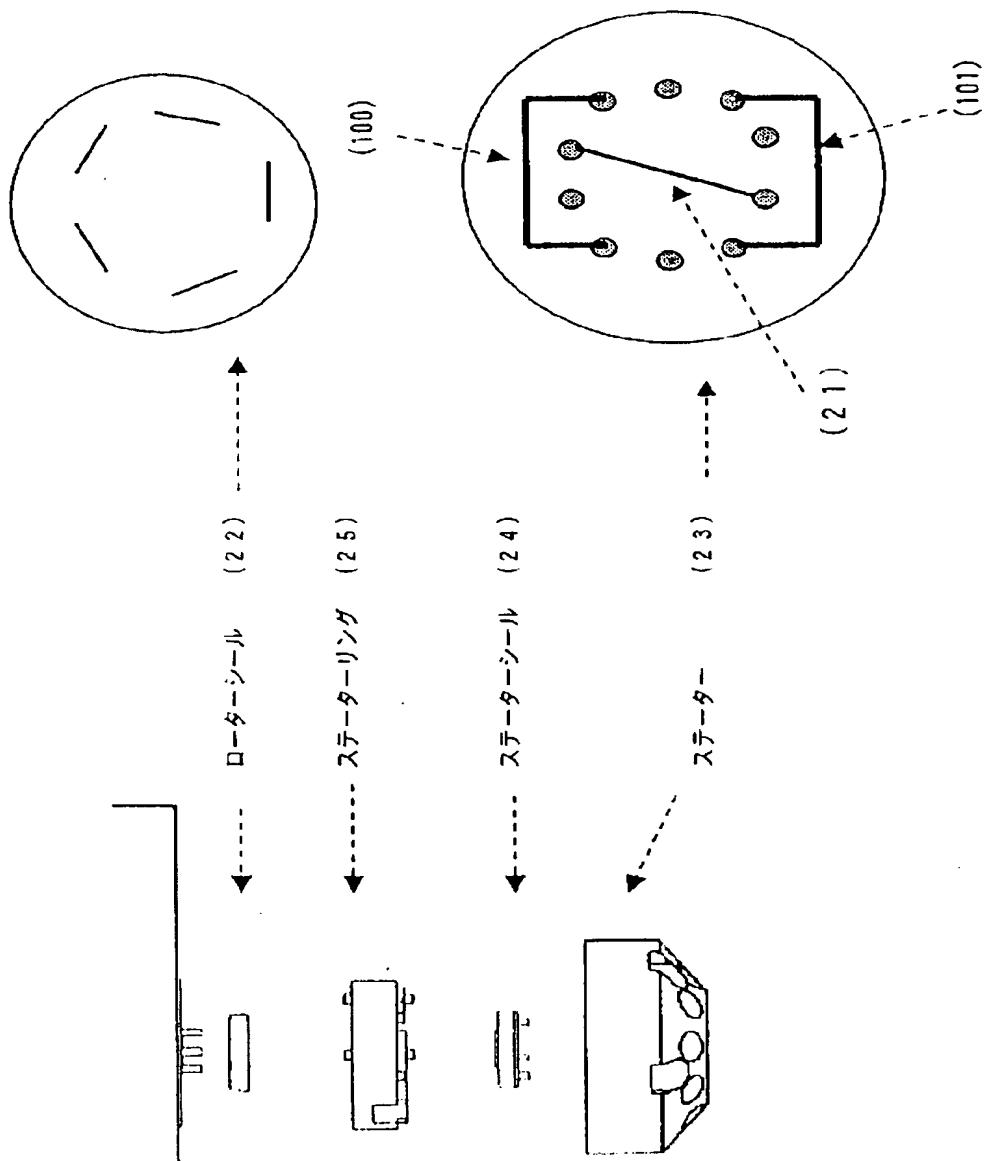
図 5

ポンプ1



【図 6】

図 6



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

ナノフロー流量($n\ l/min$)でのグラジエント溶出による分離分析を、安定で、効率よく連続して行えるようにする。

【解決手段】

複数の溶液を混合比を変更しながら送液する分離分析装置において、第1のポンプからの流路、第2のポンプからの流路、試料導入部への流路が接続され、且つ溶液を一時的に保留する第1及び第2のサンプリングループを備えた流路切り替え手段を有し、前記流路切り替え手段は、前記第1のポンプからの溶液を前記第1のサンプリングループに送液しながら、前記第2のポンプによって前記第2のサンプリングループ内の溶液を前記試料導入部側へ押出す第1の状態と、前記第1のポンプからの溶液を前記第2のサンプリングループに送液しながら、前記第2のポンプによって前記第1のサンプリングループ内の溶液を前記試料導入部側へ押出す第2の状態とを交互に繰り返すことを特徴とする。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-064319
受付番号	50300389534
書類名	特許願
担当官	北原 良子 2413
作成日	平成15年 4月18日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 3月11日
-------	-------------

次頁無

出証特 2004-3007444

特願 2003-064319

出願人履歴情報

識別番号 [501387839]

1. 変更年月日 2001年10月 3日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都港区西新橋一丁目24番14号
氏名 株式会社日立ハイテクノロジーズ